

Aus der I. Medizinischen Abteilung des
Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses
Berlin-Schöneberg
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. H. Pfeffer

DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN
VERSCHIEDENER JODIERTER AMINOSÄUREN
VON BIOLOGISCHER BEDEUTUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eduardo Zappi

aus

Haedo/Buenos Aires

Argentinien

1967

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen Auguste Viktoria
Krankenhauses

Berlin - Schöneberg

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. H. Pfeffer

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN VERSCHIEDENER JODIERTER

AMINOSÄUREN VON BIOLOGISCHER BEDEUTUNG

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eduardo Zappi

aus

Haedo/Buenos Aires

A R G E N T I N I E N

---oOo---

Dekan: Professor Dr.med. Alfred W i t t

Referent: Professor Dr.med. Karl Heinz P f e f f e r

Korreferent: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. K r e s

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.



Promoviert am: 15. 9. 1967

Meiner Frau und meinen Kindern

Der Universität von Buenos Aires

INHALTSVERZEICHNIS

E I N L E I T U N G	1
M E T H O D I S C H E R H I N W E I S	2
E R G E B N I S S E	3
I. ERGEBNISSE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE.....	3
Untersuchungen mit reinen, nicht gemischten Lösungsmitteln.	4
Untersuchungen mit organischen Lösungsmitteln, die entweder mit 1n Essigsäure- oder Ammoniaklösung gesättigt waren...	5
Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln im festen Mischungsverhältnis von 8 organisch zu 2 wässrig.....	6
Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln in Verhältnis 5:5	7
Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln in Verhältnis 2:8.....	8
Untersuchungen auf Cellulose G-Schichten mit Aceton und Methanol als organischem Bestandteil in Mischlösungsmitteln mit Wasser oder verdünnter Essigsäurelösungen....	9
Tabelle I	12
Tabelle II	13
Tabelle III	14
Tabelle IV	15
Tabelle V	16
Tabelle VI	17
II. VERGLEICH VERSCHIEDENER FARBREAKTIONEN ZUM NACHWEIS JODIRTER PHENOLISCHER AMINOSÄUREN	18
D I S K U S S I O N	20
M A T E R I A L U N D M E T H O D E N.....	22
Z U S A M M E N F A S S U N G	26
L I T E R A T U R	27

E I N L E I T U N G

Die Untersuchung der Schilddrüsen-Physiopathologie fordert neue Methoden, die eine Entdeckung minimaler Mengen nicht markierter jodierter Substanzen gestattet (13, 14, 23, 30, 31). Die Dünnschicht-Chromatographie bietet sich auf Grund ihrer Empfindlichkeit, die höher ist als bei der Papier-Chromatographie, besonders an.

Die Dünnschichtchromatographie benötigt gegenüber der Papierchromatographie weniger Zeit. Weil die Schilddrüsenhormone, während längerer chromatographischer Verfahren chemische Veränderungen erleiden können (1, 10, 15, 20, 24, 26, 27), ist auf eine schnelle Trennung besonderer Wert zu legen. Der zunehmende Gebrauch des J^{132} in der Schilddrüsendiagnostik lässt wegen der kürzeren Halbwertszeit dieses Isotopes ebenfalls chromatographische Methoden wünschenswert erscheinen, die Ergebnisse liefern, bevor die Radioaktivität zu weit gesunken ist.

Die bis jetzt veröffentlichten dünnschichtchromatographischen Verfahren (9, 21) reichen zur Trennung von Schilddrüsenhormonen und verwandten Substanzen nicht aus, weil keine dieser Methoden eine eindeutige Identifizierung aller interessierenden jodierten Aminosäuren zulässt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Sorptions- und Lösungsmittel geprüft, mit dem Ziel, ein dünnschichtchromatographisches System zu entwickeln, das eine schnelle und genaue Identifizierung aller biologisch wichtigen jodierten phenolischen Aminosäuren gestattet.

M E T H O D I S C H E R H I N W E I S

Die Dünnschichtchromatogramme wurden nach der von Stahl angegebenen aufsteigenden Technik durchgeführt. Dazu wurden folgende Sorptionsmittel als stationäre Phasen verwandt:

Aluminiumoxyd-Pulver mit Gipszusatz
Cellulose-Pulver mit Gipszusatz
Kieselgel-Pulver mit Gipszusatz

Als mobile Phasen (Fließmittel) wurden eine Reihe von neun organischen Substanzen, Wasser und wässrige Lösungen von Essigsäure und Ammoniak in verschiedenen Konzentrationen benutzt. Diese Fließmittel wurden teilweise rein, meistens aber miteinander gemischt, verwendet.

Als Testsubstanzen wurden folgende jodierte Aminosäuren benutzt:

Monojodthyronin (*),
Dijodthyronin (**),
Trijodthyronin (**),
Tetrajodthyronin (Thyroxin) (***)
Monojodtyrosin und
Dijodtyrosin.

Die chromatographierten Substanzen wurden vorwiegend mit dem Phenolgruppenreagens nach Pauly angefärbt. Das Jodreagens nach Kolthoff und Sandell wurde in verschiedenen Modifikationen überprüft. Schließlich wurde jedoch zum Jodnachweis das Reagens nach Gmelin und Virtanen benutzt.

Für die bezeichneten Substanzen haben wir der Firma Gödecke (*), den Farbwerken Höchst (**) und der Deutschen Hoffmann-La Roche (***) besonders zu danken.

ERGEBNISSE

I. ERGEBNISSE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Ergebnisse aller chromatographischen Untersuchungen sind hier kurz beschrieben und wurden auch in den Tabellen I bis VI dargestellt. Diese Tabellen sind senkrecht nach den stationären Phasen (Sorbtionsmittel) geordnet. Waagerecht sind die verschiedenen mobilen Phasen (Fließmittel) aufgeführt. Bei allen Ergebnissen wurden die jodierten Aminosäuren einzeln und immer in derselben Reihenfolge (Mono-, Di-, Tri- und Tetrajodthyronin, Mono- und Dijodtyrosin) aufgeführt.

Da die Ergebnisse der ersten Untersuchungen wegen unzulänglicher Trennung eine Berechnung von R_F -Werten nicht gestatten, wurden zur Beschreibung folgende Kriterien gewählt: jeder Testsubstanz wurde eine aus drei Ziffern bestehende Zahl zugeschrieben. Die drei Ziffern bezeichnen von links nach rechts: a) die Wanderstrecke der Substanz, b) die Qualität der erhaltenen Flecken und c) die Schwanzbildung.

- a) Die Wanderstrecke der Substanz wurde von 0 bis 4 bewertet. Dafür wurde das chromatographische Feld durch drei, zur Frontmittellinie parallel laufende Linien in vier gleich große Abschnitte geteilt. 0 bedeutet: keine Wanderung der Substanz, 4 bedeutet: maximale Wanderung bis in den höchsten Abschnitt. Die übrigen Ziffern geben die entsprechenden Zwischenwerte an.
- b) Unter Qualität der Flecken wurden vor allen Dingen Schärfe und Regelmäßigkeit der Begrenzung sowie die Größe der Flecken bewertet, wobei die besten Ergebnisse mit 3 und die schlechten mit 1 bezeichnet wurden.
- c) Die Schwanzbildung wurde nach dem Verhältnis von Längs- zu Querdurchmesser berechnet: 0 bedeutet annähernd runde, 1 bedeutet bis zu doppelt so lange wie breite und 2 bedeutet mehr als doppelt so lange wie breite Flecken.

In der Tabelle VI sind die Ergebnisse in R_F -Werten ausgedrückt.

Untersuchungen mit reinen, nicht gemischten Lösungsmitteln (Ergebnisse in Tabelle I).

Cellulose G-Schichten.

Auf Cellulose G-Schichten wanderten alle aufgetragenen Jodthyronine mit Aceton, mit Ausnahme von Thyroxin. Thyroxin und die beide Jodtyrosine blieben am Startpunkt. Die ~~Gelaufenen~~ Thyronine zeigten eine beachtliche Schwanzbildung, die Flecken waren unscharf und zerlaufen. Bei einer Trennung mit Äthanol konnte keine der Jodamino-säuren zur Entwicklung gebracht werden. Bei der Verwendung von Amyl-alkohol als Laufmittel wanderten die jodierten Thyronine nur wenig, die Jodtyrosine gar nicht. Außerdem bildeten sich bei den gelaufenen Substanzen Schwänze. Die Flecke waren zerlaufen und unscharf begrenzt. Bei der Chromatographie mit n-Butanol wanderten nur Di-, Tri- und Tetrajodthyronin, während Monojodthyronin und die jodierten Tyrosine am Startpunkt blieben. Bei den gelaufenen Substanzen waren die Flecken groß und unscharf begrenzt, außerdem trat eine erhebliche Schwanzbildung auf. Beim Versuch einer Chromatographie mit Chloroform und Dioxan konnte bei keiner der aufgetragenen Substanzen eine Wanderung erreicht werden. Anders verhielten sich die Chromatogramme mit Methanol. Hier wanderten alle aufgetragenen Substanzen relativ weit, jedoch trat eine erhebliche Schwanzbildung mit Unschärfe der Flecken auf. Eine Trennung der Substanzen untereinander war nicht zu erkennen. Bei Propanol als Laufmittel bei Cellulose-Schichten verhielten sich die Substanzen ähnlich wie bei Aceton. Bei Chromatogrammen die mit Pyridin entwickelt wurden, wanderten nur Tri- und Tetrajodthyronin, allerdings mit sehr unscharf begrenzten Flecken und langen Schwänzen. Bei Versuchen mit Wasser als Laufmittel wanderten alle untersuchten Jodaminsäuren. Am kürzesten liefen Tri- und Tetrajodthyronin, dann folgten Mono- und Di-jodthyronin und schließlich, am weitesten liefen die Jodtyrosine. Dabei waren die Schwänze geringer und die Flecken relativ scharf, jedoch unregelmäßig. Ähnliches Verhalten wurde bei der Trennung mit 1n Ammoniaklösung beobachtet. Hier liefen die Substanzen lediglich etwas weiter als bei der Entwicklung mit reinem Wasser. Auch bei Chromatographien mit 1n Essigsäurelösung wanderten alle aufgetragenen Jodamino-säuren, mit Ausnahme von Thyroxin. Am wenigsten lief Trijodthyronin, dann folgten Di- und schließlich Monojodthyronin sowie die jodierten Tyrosine. Die Schwanzbildungen waren auch hier mäßig, die Flecken relativ klein und scharf begrenzt.

Aluminiumoxyd G-Schichten

Bei den Aluminiumoxyd-Schichten wanderten die aufgetragenen Substanzen in allen untersuchten organischen Lösungsmitteln nicht. Mit reinem Wasser konnten die jodierten Tyrosine und Monojodthyronin zu Entwicklung gebracht werden. Die höher jodierten Thyronine blieben jedoch am Startpunkt haften. Bei den gelaufenen Substanzen waren die Flecken unscharf, außerdem traten erhebliche Schwanzbildungen auf. Bei der Entwicklung mit 1n Ammoniaklösung wanderten alle Substanzen bis auf Thyroxin. Am weitesten liefen Monojodthyronin und die jodierten Tyrosine. Die Flecken waren jedoch zum Teil unscharf begrenzt, jedoch traten keinen nennenswerten Schwänze auf. Bei Chromatogrammen mit 1n Essigsäurelösung als Fließmittel wanderten lediglich Monojodthyronin und die jodierten Tyrosine. Di-, Tri- und Tetrajodthyronin blieben am Startpunkt haften.

Kieselgel-G-Schichten

Auf Kieselgel G-Schichten konnte mit keinem organischen Fließmittel außer Methanol eine Wanderung erzielt werden. Bei Methanol waren die Laufstrecken kurz und die Schwanzbildung erheblich. Mit reinem Wasser wanderten die aufgetragenen Jodtyrosine am schnellsten, dann folgten Mono-, Di- und Trijodthyronin, während Tetrajodthyronin am Startpunkt haften blieb. Bei Verwendung von 1n Ammoniaklösung konnten alle aufgetragenen Jodaminosäuren zur Entwicklung gebracht werden. Am meisten wanderten auch hier die jodierten Tyrosine, dann folgten Mono-, Di-, Tri- und schließlich Tetrajodthyronin. Die Schwanzbildung war bei den letzten Substanzen erheblich. Alle Flecken waren unscharf begrenzt und zerlaufen. Bei Verwendung von 1n Essigsäurelösung konnten nur Monojodthyronin und die beiden Tyrosine zur Wanderung gebracht werden. Di-, Tri- und Tetrajodthyronin blieben am Startpunkt haften.

Untersuchungen mit organischen Lösungsmitteln, die entweder mit 1n Essigsäure- oder Ammoniaklösung gesättigt waren. (Ergebnisse in Tab.II)

Cellulose G-Schichten.

Auf Cellulose G-Schichten liefen Mono-, Di- und Trijodthyronin bei mit Ammoniak gesättigtem Amyl-Alkohol im Mittelfeld. Thyroxin wanderte weniger und die Tyrosine überhaupt nicht. Die Flecken der gelaufenen Substanzen waren groß, schwach angefärbt und mit starker

Schwanzbildung. Bei Amyl-Alkohol der mit 1n Essigsäurelösung gesättigt war, waren die Laufstrecken der Thyronine länger, die der Tyrosine kürzer. In jedem Fall waren die Flecken verwaschen und zeigten starke Schwänze. Mit Chloroform, gleichgültig, ob dieses mit 1n Ammoniak- oder Essigsäurelösung gesättigt wurde, konnte keine der aufgetragenen Substanzen zur Wanderung gebracht werden.

Aluminiumoxyd G-Schichten

Bei Aluminiumoxyd-Schichten wanderten die Testsubstanzen mit alkalisch gesättigtem Amyl-Alkohol überhaupt nicht, mit sauer gesättigtem Amyl-Alkohol nur sehr wenig. Mit alkalisch bzw sauer gesättigtem Chloroform konnte auch bei Aluminiumoxyd-Schichten keine Wanderung beobachtet werden.

Kieselgel G-Schichten

Auf Kieselgel G-Schichten liefen mit alkalisch gesättigtem Amyl-Alkohol die aufgetragenen Thyronine sehr gering, die Tyrosine überhaupt nicht. Bei Amyl-Alkohol, der mit Essigsäure gesättigt war, wanderten alle Substanzen etwas weiter. Es bildeten sich mäßig scharfe Flecken ohne Schwänze. Weder mit alkalisch noch mit sauer gesättigten Chloroformlösungen war eine Wanderung der aufgetragenen Substanzen zu erreichen.

Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln im festen Mischungsverhältnis von 8 organisch zu 2 wässrig. (Ergebnisse in Tab.III)

Cellulose G-Schichten

Bei einer Entwicklung mit Aceton/1n Ammoniaklösung liefen Di- und Trijodthyronin am weitesten, dann kamen die anderen Thyronine und schließlich Mono- und Dijodtyrosin. Die Flecken waren blass, die Schwanzbildung war mäßig. Mit Dioxan/Ammoniak liefen die Substanzen ähnlich wie bei den vorhergehenden Lösungsmitteln. Die Laufstrecken waren allerdings kürzer, die Flecken wurden verwaschen, unregelmäßig und zogen sich beim Lauf auseinander. Auch mit Methanol/Ammoniak waren die Ergebnisse ähnlich, nur liefen die Tyrosine etwas langsamer. Die Flecken waren gut begrenzt, ohne Schwanzbildung. Die Resultate mit Pyridin/Ammoniak ähnelten denen der vorherigen Untersuchung, le-

diglich die Flecken waren etwas größer. Bei den sauren Lösungsmittelsystemen mit Aceton, Dioxan und Methanol sowie Pyridin/Wasser, ähnelten die Ergebnisse einander. Die Thyronine hatten längere und die Tyrosine etwas kürzere Laufstrecken. Die stärkeren Schwanzbildungen traten bei Aceton und die kleinsten Flecken bei Dioxan und Pyridin auf. Eine Differenzierung der verschiedenen Substanzen nach der Laufstrecke war jedoch nicht möglich.

Aluminiumoxy G-Schichten

Bei allen acht geprüften Mischlösungsmitteln waren die Flecken unregelmäßig und zerlaufen. Die Wanderungsgeschwindigkeit war in jedem Fall gering.

Kieselgel G-Schichten.

Bei allen alkalischen Mischlösungsmitteln wurden mittelmäßige und sich wenig voneinander unterscheidende Laufstrecken beobachtet. Die Flecken waren klein und scharf begrenzt. Mit den sauren Mischlösungsmitteln von Aceton, Dioxan und Methanol sowie mit Pyridin/Wasser waren die Wanderstrecken der aufgetragenen Substanzen lang. Die Flecken wurden jedoch flau und waren dicht hinter der Fließmittelfront zu erkennen. Die Schwanzbildung war besonders bei Aceton und Pyridin beträchtlich.

Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln in Verhältnis 5:5 (Ergebnisse in Tab.IV)

Cellulose G-Schichten

Bei den alkalischen Lösungsmittelsystemen wanderten die aufgetragenen Substanzen weit. Mit Methanol/1n Ammoniaklösung liefen alle Testsubstanzen gleich, in Aceton, Dioxan und Pyridin blieben die Tyrosine gegenüber den Thyroninen etwas zurück. Die Flecken waren klein und gut begrenzt, Schwänze wurden nicht beobachtet. Mit allen sauren Mischlösungsmitteln wurden ebenfalls relativ weite Laufstrecken mit befriedigender Fleckbildung erreicht. Untereinander waren die Laufstrecken der verschiedenen Substanzen bei den jeweiligen Chromatogrammen meist nur wenig verschieden.

Aluminiumoxyd G-Schichten

Ähnliche Ergebnisse wurden im Allgemeinen bei Aluminiumoxyd G-

Schichten beobachtet. Bei den sauren Mischlösungsmitteln traten häufig Schwanzbildungen auf. Bei der Mischung Methanol/Essigsäure waren die Laufstrecken kürzer als bei den anderen sauren Mischlösungsmitteln. Im Allgemeinen unterschieden sich jedoch in dieser Schicht die Laufstrecken der verschiedenen aufgetragenen Jodaminosäuren nur wenig voneinander.

Kieselgel G-Schichten

In dieser Schicht wanderten die aufgetragenen Testsubstanzen sowohl in den alkalischen als auch in den sauren Mischlösungsmitteln weit. Die Laufstrecken waren untereinander kaum verschieden. Die Flecken waren klein und gut begrenzt, jedoch manchmal unregelmäßig. Schwanzbildungen traten nur gelegentlich bei Methanol/Essigsäurelösung auf.

Untersuchungen mit organisch-wässrigen Mischlösungsmitteln in Verhältnis 2:8 (Ergebnisse in Tab.V)

Cellulose G-Schichten

In Cellulose G-Schichten liefen die Aminosäuren in allen alkalischen Mischungen ohne deutlichen Unterschied weit. Die Flecken waren regelmäßig und scharf begrenzt bis auf Pyridin/1n Ammoniaklösung. Mit diesem Fließmittel bildeten sich sehr unregelmäßige Flecken, die praktisch an der Fließmittelfront lagen. Mit Aceton/1n Essigsäure dagegen liefen die Thyronine unterschiedlich weit, wobei Monojodthyronin am weitesten lief. Dann folgte Dijod-, darauf Trijodthyronin. Thyroxin blieb auf dem Auftragspunkt zurück. Die Tyrosine wanderten mit fast derselben Geschwindigkeit wie Mono- und Dijodthyronin. Mit Methanol/Essigsäurelösung fand man eine ähnliche, aber regelmäßiger Trennung der jodierten Substanzen, nur war die Laufgeschwindigkeit nicht ganz so groß. Außerdem war eine Schwanzbildung bei Di- und Trijodthyronin zu verzeichnen. Mit Dioxan/1n Essigsäure hatte Monojodthyronin zusammen mit beiden jodierten Tyrosinen die größte Laufgeschwindigkeit. Es folgten Tri- und dicht darauf Tetrajodthyronin mit langer Schwanzbildung, während Dijodthyronin wenig entfernt vom Auftragspunkt zurückblieb. Bei Pyridin/Wasser waren unregelmäßigere Flecken mit praktisch gleicher Laufgeschwindigkeit und teilweiser Schwanzbildung zu erkennen.

Aluminiumoxy G-Schichten

Bei diesen Schichten liefen die Testsubstanzen mit den alkalischen Mischungen von Aceton, Dioxan und Pyridin weit und bildeten unregelmäßige Flecken mit untereinander ähnlicher Laufgeschwindigkeit und gelegentlicher Schwanzbildung. Mit Methanol/1n Ammoniaklösung wanderten die Tyrosine am weitesten, die Thyronine entwickelten sich weniger und bildeten schwache Flecken, die in Schwänze ausliefen. Mit den sauren Mischungen und mit Pyridin/Wasser waren im Allgemeinen mittlere Laufstrecken und starke Schwanzbildungen zu beobachten. Bei Aceton/1n Essigsäure und bei Methanol/1n Essigsäure verblieb Thyroxin am Auftragspunkt.

Kieselgel G-Schichten

Die aufgetragenen Testsubstanzen liefen mit den alkalischen Mischungen unterschiedlich weit. Die Flecken waren meistens klein und unregelmäßig. Schwanzbildungen wurden nicht beobachtet. Auch mit den sauren Mischlösungsmitteln wurden im Allgemeinen weite Laufstrecken bei allen Testsubstanzen beobachtet. Thyroxin blieb jedoch bei den aceton-, dioxan- und methanolhaltigen Mischlösungsmitteln am Auftragspunkt. Die Flecken waren meistens befriedigend, Schwanzbildungen traten nur gelegentlich auf.

Untersuchungen auf Cellulose G-Schichten mit Aceton und Methanol als organischem Bestandteil in Mischlösungsmitteln mit Wasser oder verdünnten Essigsäurelösungen. (Ergebnisse in Tab.VI)

Mit Aceton/0.5n Essigsäure 2:8 zeigten die Thyronine gute Trennungen voneinander. Monojodthyronin lief am weitesten, dann folgten Di-, Tri- und Tetrajodthyronin, mit jeweils geringfügiger Schwanzbildung. Monojodthyronin und Dijodtyrosin überdeckten jedoch einander (Abb.1). Ähnlich war es bei Methanol/0.5n Essigsäurelösung. (Abb.2). Die Trennung der Thyronine war regelmäßiger als bei dem vorher angewandten Lösungsmittel. Die Schwanzbildung war jedoch hier schon bei Dijodthyronin zu beobachten. Dijodtyrosin und Monojodthyronin zeigten praktisch den gleichen R_F -Wert. Monojodtyrosin lief am weitesten und gut getrennt von den anderen Substanzen.

Bei der Mischung Aceton/Methanol/0.5n Essigsäurelösung 1:1:8 waren die Laufstrecken aller Substanzen groß. Die Verteilung der Thy-



(Abb.1)



(Abb.2)

Abb.1: von links nach rechts sind jeweils 5 μ g von Mono-, Di-, Tri- und Tetrajodthyronin, Mono- und Dijodtyrosin auf eine Cellulose G-Schicht aufgetragen. Mobile Phase Aceton-0.5n Essigsäurelösung 2:8. Farbreagens Diazotierte Sulfanylsäure.

Abb.2: gleicher Versuch, jedoch mit Methanol-0.5n Essigsäurelösung als mobile Phase.

ronine war regelmäßig. Dafür aber traten starke Schwanzbildungen auf. Die Tyrosine trennten sich nicht gut von Mono- und Dijodthyronin.

In Aceton-0.1n Essigsäure 2:8 war die Trennung der Thyronine nicht mehr so regelmäßig. Mono- und Dijodthyronin wanderten schnell und lagen nahe beieinander. Sie überdeckten sich mit den Tyrosinen. Trijodthyronin lief ungefähr bis zur Mitte des Feldes und bildete einen langgestreckten Fleck. Thyroxin kam nur wenig über den Startpunkt hinaus und zeigte die gleiche Schwanzbildung wie Trijodthyronin.

Bei Methanol-0.1n Essigsäurelösung 2:8 blieb die regelmäßige Verteilung der Thyronine erhalten, die Laufstrecken waren deutlich kleiner als bei den stärker sauren Mischungen. Die Flecken waren etwas verwaschen. Monojodtyrosin lief mit gutem Abstand von Dijodtyrosin. Letzteres hatte praktisch denselben R_F -Wert wie Monojodthyronin.

Obwohl bei Aceton-Methanol-0.1n Essigsäure 1:1:8 die Laufstrecke

und Verteilung gut war, war die Trennung von Tri- und Tetrajodthyronin wegen Schwanzbildung weniger günstig.

Bei Aceton-0.5n Essigsäurelösung 1:9 war die Bildung verwaschener Flecken und Schwänze besonders auffällig. Thyroxin blieb an der Startlinie.

Bei der Mischung Methanol-0.5n Essig 1:9 waren die Laufstrecken kürzer als bei den vorherigen methanolhaltigen Mischlösungsmitteln und die Fleckenbildung waren unscharf. Thyroxin wanderte praktisch nicht, die Tyrosine liefen am weitesten und war untereinander gut getrennt.

In Aceton-Wasser 2:8 war wegen Schwanzbildung bei Tri- und Tetrajodthyronin keine gute Trennung dieser Substanzen zu erreichen. Mono- und Dijodthyronin wanderten zwar weit, überdeckten sich jedoch mit den Tyrosinen, die ziemlich schwache Flecken bildeten. Bei Methanol-Wasser waren die Flecken ebenfalls verwaschen und zeigten starke Schwanzbildung. Die Laufstrecken aller Substanzen waren kurz.

Bei Aceton-Methanol-Wasser 1:1:8 war die Verteilung aller Substanzen zwar gut, die Flecken waren jedoch schlecht begrenzt. Es trat außerdem eine deutliche Schwanzbildung auf.

CELLULOSE G

ALUMINIUM G

KIESELGEL G

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂
ACETON	212	212	212	020	030	030		030	030	030	030	020	020
ÄTHANOL	030	030	030	030	030	030		020	030	030	030	020	010
AMYL-ALKOHOL	112	212	212	112	030	030		030	030	030	030	020	020
n-BUTANOL	030	212	312	212	020	020		030	030	030	030	020	020
CHLOROFORM	030	030	030	030	030	030		030	030	030	030	030	030
DIOXAN	030	030	030	030	030	030		020	020	030	030	020	020
METHANOL	312	312	312	312	312	212		020	020	020	020	020	020
1-PROPANOL	212	212	212	112	030	030		030	030	030	030	020	020
PYRIDIN	030	030	312	312	030	030		030	030	030	030	020	020
WASSER	221	221	110	110	320	320	3	312	030	030	030	312	412
1n AMMONIUM- LÖSUNG	320	320	321	120	420	420		420	310	311	030	420	420
1n ESSIGSÄURE- LÖSUNG	320	212	110	030	320	320		321	030	030	030	421	320

T₁ = Monojodthyronin
T₂ = Dijodthyronin
T₃ = Trijodthyronin
T₄ = Tetrajodthyronin

t₁ = Monojodtyrosin
t₂ = Dijodtyrosin

Die drei Ziffern der jeder Testsubstanz in jedem System zugeordneten
Zahl bedeuten von links nach rechts:

a) Laufstrecke (0 = nicht gelaufen; 4 = weitester Lauf)

b) Qualität der Flecke (1 = groß, unscharf abgegrenzte Flecke)

3 = klein, scharf abgegrenzte Flecke)

c) Schwanzbildung (0 = keine Schwanzbildung; 2 = stark: Schwanzbildung)

T A B E L L E I I

	CELLULOSE G					ALUMINIUM G					KIESELSIGEL G				
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁ t ₂	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁ t ₂	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁ t ₂
AMYL-ALKOHOL mit in AMMONIUM- LÖSUNG gesättigt	212	312	312	112	020 020	030	030	030	030	020 020	120	120	120	120	020 020
AMYL-ALKOHOL mit in ESSIGSÄURE- LÖSUNG gesättigt	312	312	312	412	112 212	120	120	120	120	110 110	130	120	120	220	120 120
CHLOROFORM mit in AMMONIUM- LÖSUNG gesättigt	030	030	030	030	020 020	020	030	030	030	020 020	020	020	030	030	020 020
CHLOROFORM mit in ESSIGSÄURE- LÖSUNG gesättigt	030	030	030	030	020 020	020	030	030	030	020 020	030	030	030	030	020 020

T₁ = Monojodthyronin
 T₂ = Dijodthyronin
 T₃ = Trijodthyronin
 T₄ = Tetrajodthyronin
 t₁ = Monojodtyrosin
 t₂ = Dijodtyrosin

Die drei Ziffern der jeder Testsubstanz in jedem System zugeschriebenen Zahl bedeuten von links nach rechts:

- a) Laufstrecke (0 = nicht gelaufen; 4 = weitester Lauf)
 b) Qualität der Flecke (1 = groß, unscharf abgegrenzte Flecke;
 3 = klein, scharf abgegrenzte Flecke)
 c) Schwanzbildung (0 = keine Schwanzbildung; 2 = starke Schwanzbildung)

TABELLE I I I

CELLULOSE G

ALUMINIUM G

KIESSELGEL G

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂
ACETON-1n AMMO- NIAKLÖSUNG 8:2	412	412	411	312	211	120		112	120	120	121	120	120
DIOKAN-1n AMMO- NIAKLÖSUNG 8:2	311	312	412	221	321	120		010	111	111	111	121	020
METHANOL-1n AM- MONIAKLÖSUNG 8:2	430	430	430	421	320	320		112	222	122	121	110	110
PYRIDIN-1n AL- MONIAKLÖSUNG 8:2	420	421	421	321	321	311		110	121	121	121	110	110
ACETON-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 8:2	412	412	410	412	221	321		121	121	121	121	121	121
DIOKAN-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 8:2	420	420	420	420	320	320		121	122	122	121	121	121
METHANOL-1n ES- SIGSÄURELÖSUNG 8:2	411	411	411	411	320	320		111	122	122	121	111	111
PYRIDIN- WASSER 8:2	430	430	420	420	320	320		010	010	010	010	010	010

T₁ = Monojodthyronin

T₂ = Dijodthyronin

T₃ = Trijodthyronin

T₄ = Tetrajodthyronin

t₁ = Monojodtyrosin

t₂ = Dijodtyrosin

Die drei Ziffern der jeder Testsubstanz in jedem System zugeschriebenen Zahl bedeuten von links nach rechts:

a) Laufstrecke (0= nicht gelaufen; 4= weitester Lauf)

b) Qualität der Flecke (= groß, unscharf abgegrenzte Flecke)

3= klein, scharf abgegrenzte Flecke)

c) Schwanzbildung (0= keine Schwanzbildung; 2= starke Schwanzbildung)

	CELLULOSE G						ALUMINIUM G						KIESELGEL G					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂
ACETON-in AMMO- NIKLÖSUNG 5:5	420	420	420	420	320	320	420	420	420	420	321	421	420	420	430	430	420	430
DIOXAN-in AMMO- NIKLÖSUNG 5:5	430	430	430	430	330	330	320	430	430	430	321	320	430	420	430	430	330	430
METHANOL-in AM- MONIKLÖSUNG 5:5	430	430	430	430	430	430	311	410	411	411	311	411	420	420	420	420	420	420
PYRIDIN-in AM- MONIKLÖSUNG 5:5	420	420	420	420	420	320	330	430	430	430	320	320	320	320	320	310	310	
ACETON-in ESSIG- SÄURELÖSUNG 5:5	430	430	430	422	420	420	312	312	312	311	412	412	410	410	420	412	420	430
DIOXAN-in ESSIG- SÄURELÖSUNG 5:5	430	430	430	431	420	430	322	321	322	321	312	311	320	310	320	320	430	430
METHANOL-in ES- SIGSÄURELÖSUNG 5:5	330	320	320	321	320	320	222	222	222	222	322	321	410	411	411	311	410	320
PYRIDIN WASSER 5:5	420	420	420	420	410	410	311	312	322	421	322	322	430	430	330	330	330	320

Die drei Ziffern der jeder Testsubstanz in jedem System zugeschriebenen Zahl bedeuten von links nach rechts:

a) Laufstrecke (0= nicht gelaufen; 4= weitester Lauf)

b) Qualität der Flecke (1= groß, unscharf abgegrenzte Flecke; 3= klein, scharf abgegrenzte Flecke)

c) Schwanzbildung (0= keine Schwanzbildung; 2= starke Schwanzbildung)

T₁ = Monojodthyronin
T₂ = Dijodthyronin
T₃ = Trijodthyronin
T₄ = Tetrajodthyronin
t₁ = Monojodyrosin
t₂ = Dijodyrosin

T A B E L L E V

CELLULOSE G

ALUMINIUM G

KIESELGEL G

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	t ₁	t ₂
ACETON-1n AMMO- NIAKLÖSUNG 2:8	430	430	430	430	430	430		420	420	420	420	421	421
DIOXAN-1n AMMO- NIAKLÖSUNG 2:8	430	430	430	430	430	430		420	410	410	411	411	420
METHANOL-1n AM- MONIAKLÖSUNG 2:8	430	330	330	382	430	430		311	312	312	312	421	420
PYRIDIN-1n AM- MONIAKLÖSUNG 2:8	410	410	410	410	410	410		420	420	420	420	320	310
ACETON-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8	430	330	221	030	430	330		321	312	312	030	412	412
DIOXAN-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8	421	120	321	212	330	330		320	312	312	212	321	312
METHANOL-1n ES- SIGSÄURELÖSUNG 2:8	320	222	222	030	330	230		321	212	212	030	321	212
PYRIDIN WASSER 2:8	421	412	420	421	410	410		320	322	322	322	312	321

T₁ = Monojodthyronin
T₂ = Dijodthyronin
T₃ = Trijodthyronin
T₄ = Tetrajodthyronin
t₁ = Monojodtyrosin
t₂ = Dijodtyrosin

Die drei Ziffern der jeder Testsubstanz in jedem System zugeschriebenen Zahl bedeuten von links nach rechts:

- a) Laufstrecke (0 = nicht gelaufen; 4 = weitester Lauf)
b) Qualität der Flecke (1 = groß, unscharf abgegrenzte Flecke;
3 = klein, scharf abgegrenzte Flecke)
c) Schwanzbildung (0 = keine Schwanzbildung; 2 = starke Schwanzbildung)

T A B E L L E V I

CELLULOSE G

	T_1	T_2	T_3	T_4	t_1	t_2
ACETON-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8 (*)	0.77	0.71	(0.51)	0.00	0.80	0.73
METHANOL-1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8 (*)	0.62	(0.50)	(0.29)	0.00	0.67	0.56
ACETON-0.5n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8	0.73	0.61	(0.37)	(0.17)	0.76	0.68
METHANOL-0.5n ES- SIGSÄURELÖSUNG 2:8	0.49	(0.38)	(0.16)	0.04	0.62	0.48
ACETON-METHANOL-0.5n ESSIGSÄURELÖSUNG 1:1:8	0.76	(0.65)	(0.39)	(0.14)	0.85	0.72
ACETON-0.1n ESSIG- SÄURELÖSUNG 2:8	0.74	0.68	(0.42)	(0.17)	0.77	0.68
METHANOL-0.1n ES- SIGSÄURELÖSUNG 2:8	0.51	0.37	(0.13)	0.04	0.66	0.53
ACETON-METHANOL-0.5n ESSIGSÄURELÖSUNG 1:1:8	0.67	(0.54)	(0.26)	(0.09)	0.80	0.66
ACETON-0.5n ESSIG- SÄURELÖSUNG 1:9	(0.63)	(0.46)	(0.18)	0.00	0.77	0.66
METHANOL-0.5n ESSIG- SÄURELÖSUNG 1:9	(0.49)	(0.34)	(0.11)	0.02	0.72	0.55
ACETON-WASSER 2:8	0.70	0.60	(0.28)	(0.15)	0.75	0.67
METHANOL-WASSER 2:8	0.49	(0.33)	(0.11)	0.06	0.70	0.59
ACETON-METHANOL- WASSER 1:1:8	0.63	(0.50)	(0.23)	(0.08)	0.73	0.67

(*) Diese Ergebnisse sind bereits in der TAB. V enthalten. Hier sind zum Vergleich die R_F -Werte berechnet.

Bei in Klammern gesetzten Werten trat Schwanzbildung auf.

II. VERGLEICH VERSCHIEDENER FARBREAKTIONEN ZUM NACHWEIS JODIERTER PHENOLISCHER AMINOSÄUREN

Die Anwendung von Pauly's Reagens in der üblichen Technik gestattet die Erfassung jeder der hier untersuchten phenolischen Jod-aminosäuren in Mengen von $5 \mu\text{g}$ und darüber. Es bildeten sich blau-rötliche Flecken, die sich gegen einen leicht orangen Hintergrund abheben.

Bei Verwendung des Jodreagens von Kolthoff und Sandell nach der Modifikationen von Bowden können noch kleinere Mengen (bis ca. $2 \mu\text{g}$) der Testsubstanzen nachgewiesen werden. Allerdings sind die auf gelbem Hintergrund gebildeten weißen Flecken für das bloße Auge nicht leicht wahrnehmbar.

Zusätzliches Besprühen der Platten mit o-Toluidin-, Ferroin- oder o-Phenylendiaminlösung nach den von Stolc, von Dragúnová und Langer sowie von Fletcher und Stanley vorgeschlagenen Methoden, führte ebenfalls nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Das Jodreagens von Gmelin und Virtanen bietet sich dagegen als ein direktes, schnelles und sehr empfindliches Entwicklungsmittel an, das die Erfassung jeder der untersuchten Testsubstanzen in Mengen bis zu $0.25 \mu\text{g}$ gestattet. Es entstehen blaue Flecken, die unmittelbar nach dem Besprühen der Platten auftauchen und sich gut gegen einen



Abb. 3

Von links nach rechts ist in jedem Auftragspunkt eine Mischung von je 2, 1, 0.5 und $0.25 \mu\text{g}$ Mono-, Di-, Tri- und Tetrajodthyronin auf eine Cellulose G-Platte aufgetragen. Das Chromatogramm wurde mit Aceton-0.5n Essigsäurelösung 2:8 entwickelt und anschließend mit Gmelin und Virtanens Reaktivs angefärbt. In jeder Säule sind jetzt von oben nach unten die entsprechenden Flecken von Mono-, Di-, Tri- und Tetrajodthyronin erkennbar.

leicht gelben Hintergrund abheben.

Im Laufe einer halben Stunde verwaschen sich jedoch die Flecken und der Hintergrund wird allmählich bläulich. Durch eine rechtzeitige Photographie der Platte oder durch vorsichtiges Abspülen des übriggebliebenen Farbreagens mit Wasser, bzw einfach durch Markierung der Grenzen der Flecken mit einem Glasstift, kann man weitergehende Änderungen der Ergebnisse vermeiden.

DISKUSSION

Weil bei den ersten Untersuchungen, die gleichzeitig mit drei verschiedenen stationären Phasen (Schichten) durchgeführt wurden, bei Verwendung rein organischer Fließmittel die Testsubstanzen praktisch nicht wanderten, aber mit wässrigen Fließmitteln eine gewisse Entwicklung der jodierten Substanzen, allerdings mit sehr unregelmäßig begrenzten Flecken, beobachtet werden konnte (Tab.I), wurde später versucht, die eluotrope Wirkung der organischen Fließmittel durch wässrige Zusätze zu beeinflussen.

Zunächst wurden zwei hydrophobe Fließmittel gewählt, die mit 1n Ammoniak- bzw Essigsäurelösung gesättigt wurden. Da die Ergebnisse bei allen drei Schichten (Tab.II) sich nicht wesentlich von denen unterschieden, die mit reinen, organischen Fließmitteln erzielt worden waren, wurden in einer neuen Reihe vier andere, diesmal hydrophile organische Lösungsmittel, mit zunehmendem wässrigem Anteil kombiniert, und die eluotrope Wirkung dieser Mischlösungsmittel bei allen drei untersuchten Schichten geprüft (Tab.III bis V).

Schon bei Mischungen mit geringem Wassergehalt (Verhältnis organisch/wässrig wie 8:2) ließ sich eine deutliche eluotrope Wirkung erkennen, die bei dem Verhältnis von 5:5 und besonders 2:8 noch stärker wurde. Bei etlichen dieser Lösungsmittelmischungen mit niedrigem organischem Anteil und Essigsäurelösung als wässriger Phase, zeigte sich besonders auf Cellulose G-Schichten ein Ansatz zur Trennung der aufgetragenen Substanzen, die mit einer dem Jodgehalt entgegengesetzten Geschwindigkeit liefen. Auf den beiden anderen Schichten waren die Ergebnisse, wegen der Unregelmäßigkeit der Flecken oder der starken Schwanzbildung, nur als unbefriedigend zu bezeichnen.

Auf diesem Grund wurden die weiteren Untersuchungen nur mit Cellulose G-Schichten fortgeführt. Da die besten Ergebnisse mit aceton- und methanolhaltigen Mischlösungsmitteln zu beobachten waren, wurden diese in den weiteren Versuchen geringfügig modifiziert (Tab.VI).

Die besten Resultate konnte man bei beiden Mischungen bei einem organisch/wässrigen Verhältnis von 2:8 und Verwendung von 0.5n Essigsäurelösung als wässrigem Komponent beobachten. Infolge der längeren Wanderstrecke und der deutlicheren Trennung der Thyronine ist

allerdings das System Aceton-0.5n Essigsäurelösung 2:8/Cellulose G zu bevorzugen: Hierbei gelingt die Trennung der vier jodierten Thyronine oder beider Jodtyrosine, die mit gutem Abstand voneinander laufen. Wenn alle sechs Substanzen zusammen aufgetragen sind, überdecken sich die Flecken von Monojodthyronin und Dijodtyrosin, weil ^{beide} praktisch den selben R_F -Wert haben.

Da die Anwesenheit von Mono- und sogar von Dijodthyronin in biologischem Material höchst unwahrscheinlich ist (2, 6, 11, 12, 16, 17, 18, 28), kann dieses System als gut geeignet zur schnellen und zuverlässigen Identifizierung der bis jetzt im Blut nachgewiesenen jodierten phenolischen Aminosäuren angesehen werden.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Spezifität der Methode wurde zusätzlich versucht, das in den oben erwähnten Untersuchungen verwandte Farbreagens zum Nachweis phenolischer Gruppen nach Pauly durch ein Jodreagens zu ersetzen.

Es wurde zuerst die klassische Reaktion mit Cer IV-Sulfat nach Kolthoff und Sandell, in der von Bowden für die Papierchromatographie angegebenen Technik, untersucht. Da die Ergebnisse hierbei nicht befriedigend waren, wurde endlich das von Gmelin und Virtanen angegebene Reagens mit Ferricyanid-, Ferrychlorid und Arsensäure angewandt, mit welchem der Nachweis der Substanzen bis $0.25 \mu\text{g}$ gelingt.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Dünnschichtchromatographische Technik

Es wurde die aufsteigende Technik nach Stahl (22) benutzt. Die Chromatogramme wurden bei Raumtemperatur in Glaskammern der Fa. Desaga hergestellt. Die Kammern wurden mit Filterpapier ausgekleidet. Vor dem Gebrauch wurde eine Raumsättigung des Fließmittels durch Schütteln erreicht.

Plattenzubereitung

Die Untersuchungen wurden auf Glasplatten von 20 x 20 cm Größe ausgeführt. Die Sorptionsmittel wurden mit Hilfe einer Desaga-Ausrüstung aufgetragen: die Schichtdicke wurde so eingerichtet, dass nach Trocknen jeweils ca. 5 g Sorptionsmittel auf den Platten waren. Im Einzelnen wurden die Suspensionen zum Ausstreichen folgendermassen hergestellt:

Cellulose G	25 g + Wasser	150 ml
Aluminiumoxy G	25 g + Wasser	35 ml
Kieselgel G	25 g + Wasser	35 ml

Nach der Beschichtung wurden die Platten mit warmer Luft getrocknet und in Exsiccatoren unter Blau-Gel bis zum Gebrauch bewahrt.

Sorptionsmittel

Es wurden drei verschiedenartige Sorptionsmittel gewählt:

- 1) Cellulosepulver mit Gipszusatz (MN G, Fa. Macherey, Nagel & Co). Diese Schichten sind neutral, inaktiv und ähneln in ihren Verhalten dem Filterpapier.
- 2) Kieselgel mit Gipszusatz (Kieselgel G nach Stahl, Fa. E. Merck). Dieses Sorptionsmittel ist aktiv, hat sauren Charakter und ist

besonders zur Trennung von Lipiden und sonstigen hydrophoben Substanzen geeignet.

- 3) Aluminiumoxyd mit Gipszusatz (Aluminiumoxyd G nach Stahl, Fa. E. Merck) Dieses Sorptionsmittel ergibt ebenfalls aktive, aber basische Schichten.

Lösungsmittel

Es wurden eine Reihe von neun polaren und nicht polaren organischen Fließmitteln, Wasser und wässrige Lösungen von Ammoniak- und Essigsäurelösung in verschiedenen Konzentrationen benutzt:

Aceton	für Chromatographie	Merck
Äthanol	"	"
Amyl-Alkohol	"	"
n-Butanol	"	"
Chloroform	"	"
Dioxan	"	"
Methanol	"	"
i-Propanol	"	"
Pyridin	"	"
Wasser		
Ammoniaklösung		
Essigsäurelösung		

Testsubstanzen

Die Aminosäuren-Serie bestand aus

- 3 dl-Monojodthyronin
- 3,5 dl-Dijodthyronin
- 3,3',5 dl-Trijodthyronin
- 3,3',5,5' dl-Tetrajodthyronin
- 3 dl-Monojodtyrosin
- 3,5 dl-Dijodtyrosin

Alle diese Testsubstanzen wurden in einer schwach alkalischen Lösung (0.1n NaOH), in Konzentrationen von 1 mg oder 0.1 mg pro ml angewandt.

Nachweis der Testsubstanzen

Zur Anfärbung der Flecken wurden die Platten nach der Chromatographie ca. 1/2 Std im Brutschrank bei 100° C getrocknet und dann mit einem Anfärbreagens besprüht. Dafür wurden folgende Reagentien benutzt:

- a) Pauly's Reagens zum Phenolgruppen-Nachweis
- b) Bowden's Reagens zum Jodnachweis
- c) Gmelin und Virtanen's Reagens zum Jodnachweis

Pauly's Reagens (Diazotierte Sulfanylsäure in alkalischer Lösung)

Das Diazoniumsalz wurde nach der von Waldi angegebenen Technik (29) hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde eine frische 1% Lösung mit 10% Natriumcarbonat angesetzt und auf die Platten gesprüht.

Bowden's Reagens (Ce IV-Sulfat/Natrium-arsenit) (4)

Es wurden eine Ce IV-sulfat Lösung (A) und eine Natrium-arsenit Lösung (B) hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und unter dem Abzug auf die Platte gesprüht.

Lösung A) 10 g Ce IV-sulfat werden in 1n Schwefelsäure, die zuvor auf 0 bis 5° C abgekühlt worden ist, gelöst. Die Lösung wird noch 1 Std kühl gehalten und anschließend zentrifugiert.

Lösung B) 5 g Natriumarsenit werden in 30 ml 1n Natriumlauge gelöst. Die Lösung wird unter Rühren tropfenweise in 65 ml auf 0 bis 5° C abgekühlte 2n Schwefelsäure eingebracht und dann mit Wasser bis 100 ml ergänzt.

Zusätzlich wurde in bestimmten Fällen unmittelbar nach Bowden's Reagens (3) noch eine der folgende Lösungen aufgesprüht:

- a) o-Toluidinlösung in Aceton, nach Stolc (25)
- b) 1% Ferrolinlösung in Wasser, nach Dragúnová u. Langer (5)
- c) 1% o-Phenylendiaminlösung in Aceton, nach Fletcher u. Stanley (7)

Gmelin und Virtanen's Reagens (Ferrychlorid/Kaliferrycyanid/Arsensäure (8, 19)

Es wurden drei Lösungen A, B, und C hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die drei Lösungen im Verhältnis 5:5:1 gemischt.

Lösung A: 2.7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml 2n HCl.

Lösung B: 3.5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 ml Wasser.

Lösung C: 3.8 g As_2O_3 in 10 ml 21% NaOH lösen, nach dem Abkühlen 2 ml 6% NaOH zugeben und danach 65 ml 2n HCl unter kräftigem Umrühren dazu geben.

Dokumentation

Nach Markieren der Grenzen der Flecken mit einem Glasstift, wurden diese auf einem Papierbogen durchgepaust. Auf demselben Bogen wurden auch die Auftragungspunkte der Substanzen und die Grenze des Fließmittellaufs bezeichnet.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Durch eine systematische Untersuchung, die mit verschiedenen Sorptions- und Lösungsmitteln ausgeführt wurde, konnte man eine Reihe dünn-schicht-chromatographischer Systeme beobachten, die die Trennung von vier jodierten Thyronine oder zwei Jodtyrosinen gestatten.

Alle diese Systeme bestehen aus Cellulose G als stationärer Phase und aus einer Mischung von schwacher Essigsäurelösung mit einem niedrigen organischen Anteil von Aceton oder Methanol als mobiler Phase.

Von allen diesen Systemen kann man Aceton 0.5n Essigsäurelösung 2:8/Cellulose G als das beste betrachten. Mit diesem System trennen sich die Testsubstanzen mit guten Abständen und ohne Schwanzbildung. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mono-, Di-, Tri- und Tetraiodthyronin und Mono- und Dijodtyrosin bleiben aber nach dem chromatographischen Verfahren Monoiodthyronin und Dijodtyrosin in einem Fleck zusammen.

Unter Anwendung eines Phenolgruppen-Reagens kann man nach der Chromatographie $5\mu\text{g}$ jeder der betreffenden Testsubstanzen erfassen. Bei Verwendung eines Jodreagens kann man sogar $0.25\mu\text{g}$ jeder Aminosäure nachweisen.

---00000---

L I T E R A T U R

- 1) Acland D.J.
A Possible Source of Artifacts in the Chromatography of Tissue Extracts Containing Inorganic Iodide.
Nature, 170, 32, (1952)
- 2) Béraud T.
Repartition de l'iode organique plasmatique en physiopathologie thyroïdienne
Schweiz.med.J., 90, 1340, (1960)
- 3) Björkstén F., Gräsbeck R., Lamberg B.A.
Methods for the Paper Chromatographic and Paper Electrophoretic Separation of Iodide, Iodotyrosines, Iodothyronines and their Derivatives.
Acta chem.scand., 15, 1165, (1961)
- 4) Bowden C.H., Mac Lagan N.F., Wilkinson J.H.
The Application of the Ceric Sulfate-Arsenious Acid Reaction to the Detection of Thyroxine and Related Substances.
Biochem.J., 59, 93, (1955)
- 5) Dragúnová I., Langer P.
Detection of Iodine-containing Substances on Paper Chromatograms.
Nature, 178, 537, (1956)
- 6) Dunn J.T., Werner S.C.
Metabolism of L-Thyroxine ($3:5^{131}\text{I}$) in Man.
J.Clin.Endocrinol., 24, 460, (1964)
- 7) Fletcher K., Stanley P.G.
Detection of Iodine-containing Compounds on Paper Chromatograms.
Nature, 175, 730, (1955)

- 8) Gmelin R., Virtanen A.S.
A Sensitive Colour Reaction for the Paper Chromatographic Detection of Iodide, Iodinated Tyrosines and Thyronines.
Acta chem.scand., 13, 1468, (1959)
- 9) Hollingsworth D.R., Dillard M., Bondy P.K.
Separation of Iodoamino Acids and Related Compounds by Thin-Layer Chromatography.
J.Lab.& Clin.Med., 62, 346, (1963)
- 10) Kennedy T.H.
Identification of Two Artifacts in an Alkaline Hydrolysate of Thyroid Tissue.
Nature, 179, 50, (1957)
- 11) Klein E.
Der endogene Jodhaushalt des Menschen und seine Störungen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1960, S. 5
- 12) Klein E.
Normaler und pathologischer Umsatz von Schilddrüsenhormonen in der Körperperipherie.
Klin.Wschr., 40, 3, (1962)
- 13) Koutras D.A., Alexander W.D., Harden R.Mc.G., Wayne E.
Effect of Small Iodine Supplements on Thyroid Function in Normal Individuals.
J.Clin.Endocrinol., 24, 857, (1964)
- 14) Mandl R.H., Block R.J.
Methods for the Qualitative, Semiquantitative and Quantitative Determination of Iodoamino Acids and of Inorganic Iodide in Iodo-protein Digest and in Human Serum.
Arch.Biochem.Biophys., 81, 25, (1959)
- 15) Owen Ch.A., McKenzie B.F., Orwin A.L.
An Artifact in Thyroxine Chromatography using Dioxan.
J.Lab.& Clin.Med., 47, 145, (1956)

- 16) Pitt-Rivers R.
Biochemistry and Physiology of Thyroid Hormones.
N.Y.St.J.Med., 63, 43, (1963)
- 17) Pitt-Rivers R., Sacks B.I.
The Thyroid Hormones and Their Transport in Blood.
In: 10. Symposium d. Deutschen Gesellschaft f. Endokrinologie,
Schriftleitung E. Klein.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1964, S. 1
- 18) Pitt-Rivers R., Tata J.R.
The Chemistry of Thyroid Diseases.
Charles Thomas Publ., Springfield, 1960, S. 3
- 19) Postmes T.
A Sensitive Simple Quantitative Reaction for Iodinated Amino
Acids of Human Serum on Paper Chromatography.
Acta endocrinol., 42, 153, (1963)
- 20) Roche J., Michel R., Volpert E.
Sur la formation d'acides aminés iodés dans la caséine en pre-
sence de xantineoxidase et d'iodures minéraux
C.R.Soc.Biol., 148, 21, (1954)
- 21) Schneider G, Schneider C.
Dünnschichtchromatographie von Jodaminosäuren.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem., 333, 316, (1963)
- 22) Stahl E.
Geräte zur Dünnschicht-Chromatographie und ihre Handhabung.
In: Dünnschicht-Chromatographie. Herausgegeben von E.Stahl
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 19
- 23) Stambury J.B., Morris M.L.
The Metabolism of 3:3'-Diiodothyronine in Man.
J.Clin.Endocrinol., 17, 1324, (1957)
- 24) Stanley P.G.
Artefacts Produced from 3-Iodo-Tyrosine and 3:5-Diiodo-Tyrosine

by Heating with Alkali.
Nature, 171, 933, (1953)

- 25) Stole Viktor
Chromatographic Detection of Minute Quantities of Thyroxine in Serum.
Nature, 182, 52, (1958)

- 26) Taurog A., Chaikoff I.L., Tong W.
The Nature of Plasma Iodine as Revealed by Filter Paper Partition Chromatography.
J.Biol.Chem., 184, 99, (1950)

- 27) Tong W., Chaikoff I.L.
Hydrolysis of I^{131} Thyroprotein by Pancreatic Enzymes.
J.Biol.Chem., 232, 939, (1958)

- 28) Vanotti A., Béraud T., Dorta T.
Distribution des composés iodés plasmatiques dans diverses maladies thyroïdiennes.
In: Advances in Thyroid Research, Gen.Editor. R. Pitt-Rivers
Pergamon Press, New York, Oxford, London, Paris, 1961, S. 434

- 29) Waldi D.
Sprühreagentien für die Dünnschicht-Chromatographie.
In: Dünnschichtchromatographie. Herausgeber E. Stahl
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 501

- 30) Werner S.C., Block R.J.
Discrepancy between the Distribution of Iodine in Human Serum when Stimated by Iodine-131 and Iodine-127.
Nature, 183, 406, (1959)

- 31) Werner S.C., Radichewich I.
Presence of Iodine-127 Iodotyrosines in Extracts of Normal Human Serum.
Nature, 197, 887, (1963)

In tiefer Dankbarkeit Herrn Prof. Dr. K.H. Pfeffer
für seine ständige Unterstützung und wertvolle
Anleitung.

Herrn Chefarzt Dr. E. Lux und den Schwestern vom
Maria Trost Krankenhaus, die mit ihrem Verständnis
die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

LEBENS LAUF

Am 22. III. 1926 wurde ich in Buenos Aires, Argentinien als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Enrique V. Zappi und seiner Ehefrau Amelia, geb. Betti, geboren.

Ich besuchte vom Jahre 1932 bis 1944 die Grundschule und die höhere Schule in Bs.As. Dort bestand ich in Dezember 1944 die Reifeprüfung.

1945 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Bs.As., welches ich 1952 mit dem Erwerb des Arzt-Titels beendete.

Während meines Studiums war ich Hilfsassistent an den Instituten für Anatomie und für Biochemie; außerdem Laborassistent im "Hospital Rivadavia" und Praktikant des "Hospital Fernández" in Bs.As..

Nach Abschluß meines Studiums 1952 begann ich die Arbeit in meiner Privatpraxis. Gleichzeitig übernahm ich die folgenden Tätigkeiten:

1952 wurde ich Assistent am Institut für Biochemie (Prof.A.Stoppani, Med.Fak.Univ.Bs.As.)

1953-1960 Assistenzarzt in der Endokrinologischen Abteilung des "Hospital Rivadavia" (Prof. E.del Castillo)

1953 erlangte ich ein Stipendium der Fa. A.R.Squibb & Sons" zum Studium des Zuckerstoffwechsels der Akromegaliker".

1960 verließ ich das Hospital Rivadavia, um in das Laboratorium des "Instituto de Endocrinología de los Institutos Nacionales de la Salud, Bs.As." (Prof.F.A.de la Balze) einzutreten.

1961 Wurde ich von der "Schering A.G., Berlin" zu einem Studienaufenthalt eingeladen.

Vor meiner Abreise von Bs.As. besuchte ich einen Ausbildungskursus der "Comisión Nacional de la Energía Atómica Argentina".

Seit 1962 bin ich Assistenzarzt im "Maria Trost-Krankenhaus" Berlin-Lankwitz, seit 1963 Assistenzarzt im Auguste-Viktoria Krankenhaus, Berlin-Schöneberg.

Veröffentlichungen und Mitteilungen.

1962 "Modificaciones de los lípidos y lipoproteínas suéricas humanas por acción de andrógenos y estrógenos en sujetos de edad avanzada.

Medicina (Bs.As.), 9, 22, (1962)

1964 "Influencia de la administración de algunos medios de contraste radiológico iodados en la captación de I^{131} en la rata albina macho."

Erscheint in der "Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo"

1965 "Eine Methode der dünn-schicht-chromatographischen Trennung von schilddrüsenaktiven Jodaminosäuren"

Klin.Wschr., 43, 515, (1965)

Ich habe verschiedene Mitteilungen bei der "Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo", "Instituto de Biología y Medicina Experimental", u.s.w. geführt.

Ich bin Mitglied der "Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo" und der "Asociación Médica Argentina".

Ich bin verheiratet und habe drei Kinder

Eduardo Zappi

